

Obsah prenylovaných flavonoidů chmele v českých a zahraničních pivech

The content of hop prenylflavonoids in czech and foreign beers

KAREL KROFTA

Chmelářský institut s. r. o., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec

Hop Research Institute, Co., Ltd., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec

e-mail: k.krofta@telecom.cz

Krofta, K.: Obsah prenylovaných flavonoidů chmele v českých a zahraničních pivech. Kvasny Prum. 56, 2010, č. 1, s. 2–9.

Obsah isoxanthohumolu (IX) ve většině různých značek českých a zahraničních pív nepřesáhl hranici 2000 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Koncentrace xanthohumolu (XN) byla většinou do 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Nejvíce prenylflavonoidů ze všech zkoumaných pív bylo nalezeno v tmavém 12% ležáku - 2522 $\mu\text{g.l}^{-1}$ IX a 505 $\mu\text{g.l}^{-1}$ XN. V průměru méně prenylflavonoidů obsahují výčepní a nealkoholická piva vzhledem k slabšímu chmelení s vyšším podílem CO_2 -extraktů. Hladinu IX v pivech lze ovlivnit výběrem odrůdy chmele s vysokým poměrem XN/alfa kyseliny. Nejvíce xanthohumolu se do varního procesu vnáší chmelením odrůdami Sládek a Žatecký červeňák. Sledování obsahu IX v meziproduktech výroby piva ve dvou průmyslových pivovarech potvrdilo, že během výroby piva dochází k výrazným ztrátám. Největší úbytky byly zjištěny při chlazení mladiny, kvašení a filtraci. Míra využití XN při výrobě piva v provozním měřítku je zhruba 20 až 30 %. Sledování stability obsahu IX a XN v hotových lahvových pivech, prováděné po dobu 3 měsíců, ukázalo, že úbytek IX se pohybuje v rozmezí 10 až 15 % v závislosti na skladovací teplotě. Úbytek XN byl vyšší a činil přibližně třetinu původního množství.

Krofta, K.: The content of hop prenylflavonoids in czech and foreign beers. Kvasny Prum. 56, 2010, No.1, p. 2–9.

The content of isoxanthohumol (IX) in most of Czech and foreign beer brands did not exceed the limit of 2000 $\mu\text{g.l}^{-1}$. The concentration of xanthohumol (XN) was up to 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$. The largest quantities of prenylflavonoids in all beers investigated were found in Czech dark 12 % lager (2522 $\mu\text{g.l}^{-1}$ IX and 505 $\mu\text{g.l}^{-1}$ XN). On average less prenylflavonoids were found in draught and alcohol-free beer brands due to the lower hopping rate and the higher proportion of CO_2 -extracts. Choosing a hop variety with a higher XN/ α -acids ratio can influence the level of IX in the beer. The amount of prenylflavonoids in beers increases if Sladek and Saazer are used for hopping. The monitoring of isoxanthohumol concentrations in intermediate products during the brewing process, in two industrial breweries confirmed that high losses occur in the course of beer production. The critical points are cooling of wort, fermentation and filtration. The total amount of xanthohumol remaining after the beer production in full operating scale is approximately 20–30 %. Tracing of the stability of the IX and XN contents in bottled beers, which was done over a period of 3 months, showed that the concentration of IX was reduced by 10–15 % depending on the storage temperature. Losses of XN were higher and reached about one third of the original content.

Krofta, K.: Der Gehalt an prenylovanen Hopfenflavonoiden in den tschechischen und ausländischen Bieren. Kvasny Prum. 56, 2010, Nr. 1, S. 2–9.

In den meisten tschechischen und ausländischen Bieren hat der Gehalt an Isoxanthohumol (IX) die Grenze von 2000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ nicht überschritten. Konzentration des Xanthohumols (XN) wurde zumeist bis zum 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Die allergrößte Menge von prenylovanen Hopfenflavonoiden aus allen geprüften Bieren wurde im dunklen Lagerbier (12% Stammwürze) gefunden: 2522 $\mu\text{g.l}^{-1}$ IX und 505 $\mu\text{g.l}^{-1}$ XN. Die Schankbiere und alkoholfreie Biere. enthalten im Durchschnitt wenig Flavonoide durch die reduzierte Hopfengabe mit einem höheren CO_2 Extrakt. Der Gehalt an Isoxanthohumol (IX) im Bier kann durch die Auswahl einer Hopfensorten mit einem hohen Verhältnis XN/Alfa Säuren beeinflusst werden. Im Brauprozess wird die größte Menge Xanthohumol ins Bier durch die Zugabe von den Hopfensorten Sládek und Žatecký červeňák hereingebracht. Durch die Verfolgung des Gehalts von Isoxanthohumol (IX) in Semiprodukten in den zwei großen Industriebrauereien wurde es bestätigt, dass während der Bierherstellung zu seinen bedeutenden Verlusten vorkommt. Während der Würzekühlung, Gärung und Filtration wurden die größten Rückgänge von Isoxanthohumol (IX) festgestellt. Im einen industriellen Maßstab während der Bierherstellung wird der Isoxanthohumol (IX) etwa von 20% bis zu 30% ausgenutzt. Die in drei Monaten durchgeführte Verfolgung der Stabilität des Gehalts an Isoxanthohumol (IX) und Xanthohumols (XN) im Flaschenbier hat es gezeigt, dass in der Abhängigkeit von Lagertemperatur der Gehaltsrückgang von Isoxanthohumol (IX) im Bereich von 10% bis zu 15% lag. Der Gehaltsrückgang von Xanthohumol (XN) wurde größer, etwa eine Drittel der ursprünglichen Menge.

Klíčová slova: Chmel, pivo, xanthohumol, isoxanthohumol, kapalinová chromatografie, extrakce na tuhé fázi

Keywords: Hop, beer, xanthohumol, isoxanthohumol, liquid chromatography, solid phase extraction

1 ÚVOD

Chmel, jako základní surovina pro výrobu piva, je jediným zdrojem prenylflavonoidů xanthohumolu, isoxanthohumolu a 8-prenylarigeninu (8-PN) v tomto nápoji. Význam uvedených látek v posledním desetiletí rapidně stoupl z důvodu objevení řady bioaktivních účinků [1]. V případě xanthohumolu se jedná především o inhibiční působení na některé typy rakovinného bujení, antimikrobiální, protizánětlivé a antioxidační účinky. Chemopreventivní účinek isoxanthohumolu při karcinogenezi většinou spočívá v inhibici metabolické aktivity prokarcinogenů, zvýšení aktivity karcinogen-detoxifikačních enzymů nebo inhibici růstu nádorů v raném stadiu [2, 3, 4, 5]. Xanthohumol společně s některými složkami chmelových pryskyřic také působí inhibičně při vzniku osteoporózy [6]. Bioaktivní účinky isoxanthohumolu jsou obdobné jako u xanthohumolu, ale slabší [7]. Nižší účinnost je do určité míry kompenzována vyššími koncentracemi a snadnou dostupností v pivu. Xanthohumol byl dlouhá léta považován za zdroj estrogenických účinků chmele. Na základě rozsáhlých biotestů frakcionovaných chmelových extraktů však Milligan et al. [8] identifikoval jako původce estrogenických účinků chmele 8-prenylarigenin. Porovnáním estrogenických účinků 8-PN s dalšími látkami z jetele či sóji se uká-

1 INTRODUCTION

The only source of the prenylflavonoids xanthohumol, isoxanthohumol and 8-prenylarigenin (8-PN) in beer is hops. In the last decade the importance of these substances has been increasingly highlighted due to the number of bioactive effects discovered [1].

For example xanthohumol presumably acts as an inhibitor in different kinds of cancer tumours and has anti-microbial, anti-inflammatory and anti-oxidative effects.

Chemopreventive protection by xanthohumol during the onset of a cancer is mostly based on an inhibition of the metabolic activation of pro-carcinogens, enhanced activity of the carcinogenic-detoxification enzymes and on the inhibition of tumour growth in an initial stage [2, 3, 4, 5]. Xanthohumol together with some others components of hop resins acts as an inhibitor in the development of osteoporoses [6]. Bioactive effects of isoxanthohumol are similar to those of xanthohumol but weaker [7]. The lower efficiency is partially compensated by higher concentrations and by easier availability in beer. For many years xanthohumol was considered as the source of the estrogenic effects of hops. But based on extensive biological tests on fractionated hop extracts, Milligan et al. [8] identified 8-prenylarigen-

zalo, že se jedná o neúčinnější dosud známý fytoestrogen. Fytoestrogeny jsou přírodní látky, které se strukturně i funkčně podobají estrogenům hormonálním. Používají se např. k substituční léčbě žen ke zmírnění zdravotních potíží v postmenopauzálním období. Přírodním zdrojem 8-PN v pivu je izomerace desmethyloxanthohumolu (DMX), který je obsažen ve chmelu v množství 0,10 až 0,40 % hm. [10]. V běžných pivech jsou koncentrace 8-PN velmi nízké (< 50 µg/l), považované za fyziologicky zanedbatelné [9]. Bylo však zjištěno, že bakterie střevního traktu jsou schopny transformovat isoxanthohumol přítomný v pivu na 8-PN. Denní příjem fytoestrogenů pravidelnou konzumací piva tak může stoupnout až na fyziologicky aktivní hladinu [11, 12].

Ačkoli xanthohumol je nejvíce obsažen ve chmelu, v pivu je jeho množství minoritní díky termické izomeraci na isoxanthohumol. Isoxanthohumol je naopak dominantním prenylflavonoidem v pivu [13]. V průběhu pivovarského procesu dochází k velkým ztrátám prenylflavonoidů způsobeným nedokonalou extrakcí do mladiny, adsorpcí na sladové proteiny a kvasinky. Stevens uvádí, že celková využitelnost xanthohumolu, převážně v izomerované formě, je 20 až 30 % [14]. K dalším ztrátám prenylflavonoidů dochází při stabilizaci a filtraci, čímž využitelnost dále klesá na 10 až 20 % [15]. Obsah xanthohumolu v běžných světlých pivech je tak menší než 0,1 mg.l⁻¹, obsah isoxanthohumolu nepřesahuje zpravidla hranici 2,0 mg.l⁻¹ [16]. Struktura nejdůležitějších prenylflavonoidů nacházejících se ve chmelu a pivu je uvedena na obr. 1. Analytické stanovení chmelových prenylflavonoidů v pivu se provádí téměř výlučně kapalinovou chromatografií, nejlépe ve spojení s hmotnostními detektory. Stevens touto technikou identifikoval v pivu nejen XN a IX, ale i minoritní prenylflavonoidy jako 6- a 8-prenylarigenin, 6-geranylaringenin [16]. Analýza prenylflavonoidů metodou HPLC ve spojení s UV detektorem je možná pouze pro XN a IX po zakoncentrování analytů extrakcí na pevné fázi [17]. Originální postup stanovení 8-prenylarigeninu po derivatizaci metodou plynové chromatografie publikoval Tekel [18].

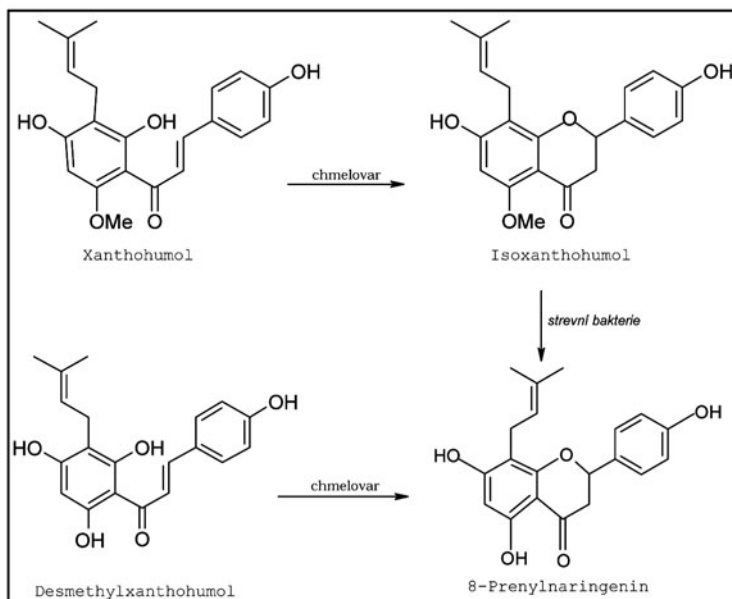
Díky pozitivním účinkům na lidské zdraví se logicky objevily snahy podstatně zvýšit koncentrace xanthohumolu a isoxanthohumolu v pivech. Toho lze dosáhnout pouze technologickými úpravami a použitím preparátů obohacených xanthohumolem [19]. První piva s vyšším obsahem xanthohumolu, tj. nad 1 mg.l⁻¹, byla uvedena na trh v Německu. Při jejich výrobě byla použita tzv. technologie „XAN“ spočívající v aplikaci extraktů obohacených xanthohumolem, přidávaných ke konci chmelovaru [20].

Tato práce shrnuje aktuální data o obsahu xanthohumolu a isoxanthohumolu v souboru českých a zahraničních piv, který byl získán v časovém období 2004 až 2009. Ve spolupráci s průmyslovými pivovary byly zjišťovány obsahy isoxanthohumolu a míra jeho ztrát v průběhu varního procesu v provozních podmínkách. V hotových pivech byla dále zkoumána stabilita prenylflavonoidů v časovém intervalu tří měsíců.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Chemikálie

Standards xanthohumolu a isoxanthohumolu o čistotě > 95 % byly zakoupeny u firmy Phytochem GmbH (Ichenhausen, SRN). Standardní roztoky prenylflavonoidů o koncentraci 40 µg.l⁻¹ byly připraveny v methanolu okyseleném kyselinou mravenčí. Skladované v chladnu a temnu byly stabilní minimálně po dobu 4 týdnů. Rozpouštědla pro separační postupy a HPLC analýzu dodala firma Merck, kyselinu fosforečnou p.a. (85 %) firma Lach-Ner s. r. o. Obsah



Obr. 1 Struktura nejvýznamnějších prenylovaných flavonoidů chmele a piva
/ Fig. 1 Structures of the most important prenylflavonoids in hops and beer.

genin as the source of the estrogenic effects of hops.

A comparison to other components from clover and soya showed that 8-PN is the most effective phytoestrogen currently known. Phytoestrogens are natural substances with a similar structure and function as the hormone estrogen. They are often used for example as hormone substitutes for women with postmenopausal problems. The 8-PN in beer results from an isomerisation of desmethyloxanthohumol (DMX). Hops contain between 0.10 and 0.40 % of DMX [10]. The concentrations of 8-PN in common beers are very low (< 50 µg/l) and are considered as physiologically non-relevant [9]. However, it was found that microorganisms in the intestinal tract are able to transform the isoxanthohumol present in beer to 8-PN. By regular consumption of beer the daily intake of phytoestrogen can reach an active physiological level [11,12].

Although xanthohumol has the highest presence in hops, its concentration in beer is significantly diminished due to thermic isomerisation to isoxanthohumol. The dominant prenylflavonoid in beer is isoxanthohumol [13]. High losses of prenylflavonoids result during beer production. These are caused by an insufficient extraction from hopped wort and an adsorption on malt proteins and yeasts. According to Stevens the total availability of xanthohumol (mainly as isomer) is 20 to 30 % [14]. Further losses of prenylflavonoids result from the stabilization and filtration processes. These caused an additional reduction with final availability between 10 and 20 % [15]. Consequently, the content of xanthohumol in common pale beers is lower than 0.1 mg/l and the content of isoxanthohumol generally does not reach the limit of 2.0 mg/l [16]. The structures of the most important prenylflavonoids in hops and beer are shown in Fig. 1.

The analytical determination of prenylflavonoids in beer is mostly carried out using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Stevens used this method for the identification of xanthohumol and isoxanthohumol as well as for minority prenylflavonoids such as 6- and 8-prenylarigenin [16]. The determination of prenylflavonoids by HPLC equipped with a UV-detector is possible only for xanthohumol and isoxanthohumol namely after concentration of the analyte by means of solid phase extraction [17]. An imaginative approach for the determination of 8-prenylarigenin by GC after a derivatisation was published by Tekel [18].

Due to a positive impact on the state of health the desire for a significant increase of xanthohumol and isoxanthohumol concentrations in beers emerged. This target can only be reached through technological modifications and by using of additives rich in xanthohumol [19]. The first beers enriched in xanthohumol (> 1 mg/l) were introduced in Germany. During the production, so-called XAN-technology, consisting of the addition of xanthohumol-rich extracts before the end of wort boiling was used [20].

This study summarizes current data on the contents of xanthohumol and isoxanthohumol in Czech and foreign beers collected from 2004 to 2009. In cooperation with the brewing industry the contents of isoxanthohumol and the rate of decrease during the wort boiling in full operating scale were determined. Further the stability of prenylflavonoids in bottled beers over a time period of three months was studied.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals

Standards of xanthohumol and isoxanthohumol with purity > 95% were obtained from Phytochem GmbH (Ichenhausen, D). For standard solutions of prenylflavonoids with a concentration 40 mg/l methanol acidified by formic acid was used. The solutions remained stable for at least 4 weeks if kept cool and dark.

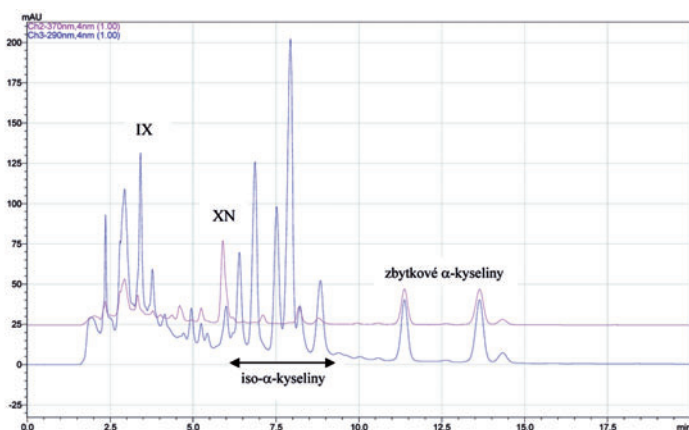
prenylflavonoidů byl zkoumán v různých typech českých a zahraničních piv (ležáky, výčepní a nealkoholická, piva tmavá a speciální). Piva byla zakoupena v běžné obchodní síti.

2.2 Zpracování vzorků piv

Piva byla nejprve zbavena oxidu uhličitého sonikací po dobu 10 minut. Zakoncentrování analytů bylo prováděno extrakcí na pevné fázi (SPE) modifikovaným postupem dle Stettnera [21]. Zpracování vzorků piv bylo prováděno na silikagelových kolonkách Strata C-18 E 500 mg/6ml (Phenomenex) v prostředí methanol-voda s přidávkou koncentrované kyseliny fosforečné. Volba uvedeného typu byla výsledkem testování SPE kolonek od několika výrobců. U kolonek Strata bylo dosaženo nejlepšího odstranění balastních látek s dobrou opakovatelností. Kondicionace kolonek byla provedena 10 ml čistého methanolu a 10 ml vody okyselené kyselinou fosforečnou (100:0,2 obj.). Dále bylo přes kolonu zfiltrováno 50 ml piva s přidávkou 0,1 ml kyseliny fosforečné. Po vysušení proudem vzduchu po dobu 5 minut byly nečistoty eluovány 10 ml směsí methanol-voda-kyselina fosforečná (50:50:0,2 obj.). Eluce prenylflavonoidů byla provedena 2,5 ml okyseleného methanolu (100:0,2 kyselina fosforečná obj.). Deset mikrolitrů eluátu bylo po důkladném promíchání aplikováno na kolonu kapalinového chromatografu. Výťažnost analytického postupu byla testována na vodném roztoku glukózy o koncentraci 50 g.l⁻¹ s přidávkou 5 % obj. ethanolu na koncentrační hladině 2 mg/l isoxanthohumolu a 0,5 mg/l xanthohumolu. Výťažnost koncentračního kroku byla 91 ± 5 % rel. pro oba prenylflavonoidy.

2.3 HPLC analýza

K vlastní analýze piv a identifikaci složek byla použita kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole (DAD). Analytické stanovení prenylflavonoidů bylo provedeno na chromatografech SHIMADZU LC 10A a LC 20A a kolonách Nucleosil EC, 250x4,0 mm, 5 μm, C18 Hop (Macherey-Nagel) a Gemini, 250x4,6 mm, 5 mm, C18 (Phenomenex). Mobilní fáze měla složení acetonitril:voda:kyselina mravenčí (700:300:3 obj.). Eluce analytů byla na obou kolonách prováděna izokraticky při průtoku mobilní fáze 0,8 ml.min⁻¹. Látky byly detekovány detektorem diodového pole při vlnové délce λ = 290 nm (isoxanthohumol), λ = 314 (α - a β-kyseliny) a λ = 370 nm (xanthohumol a DMX). Eluční profily chmelových látek na použitých kolonách, zobrazené na obr. 2 a 3, jsou velmi rozdílné. Na koloně Nucleosil se chmelové látky postupně eluují v pořadí IX, XN, klastři šesti izomerů iso-α-kyselin a nakonec rezidua základních analogů α-kyselin (kohumulon, humulon, adhumulon). Separace prenylflavonoidů ani čistota chromatografických pásů však nejsou uspokojivé. Na koloně Gemini se prenylflavonoidy separují ve stejném pořadí, ale v podstatně delších elučních časech a v mnohem vyšší čistotě píků. Z tohoto důvodu byly další experimentální práce prováděny na koloně Gemini. Kvantifikace prenylflavonoidů byla provedena pomocí vnějších standardů. Limit stanovitelnosti pro IX je 10 μg.l⁻¹, pro XN 5 μg.l⁻¹. Variací koeficient 10 opakovaných stanovení prenylflavonoidů v pivu byl 3,4 % rel. pro XN a 2,5 % rel. pro IX, což lze považovat za akceptovatelný výsledek.



Obr. 2 Separace analytů na koloně Nucleosil EC, 250 x 4,0 mm, 5 μm, C18 Hop (Macherey-Nagel), mobilní fáze acetonitril : voda : kyselina mravenčí (700 : 300 : 3 obj.), průtok 0,8 ml.min⁻¹.

Solvents for the separation procedures and HPLC analyses were obtained from Merck (Darmstadt, D) and phosphoric acid p.a. (85%) from Lach-Ner s. r. o. (Neratovice, CZ). The content of prenylflavonoids was determined in different sorts of Czech and foreign beers such as lager and draught beers, non-alcoholic beers, dark and special beers. The beers were bought in the common sales network.

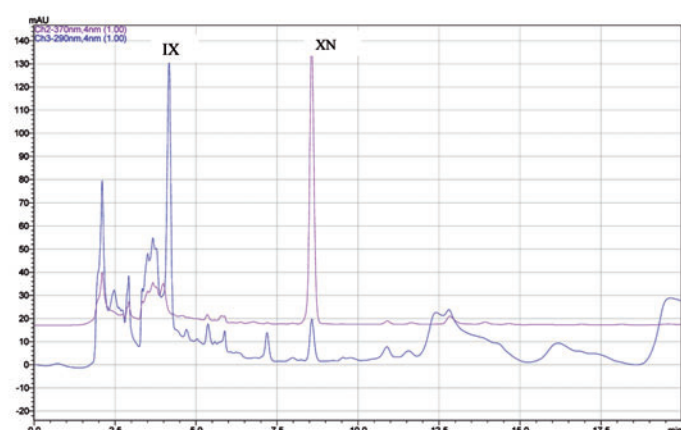
2.2 Treating of beer samples

Beers were degassed in an ultrasonic bath for 10 minutes. For the concentration of the samples a modified method by Stettner using solid phase extraction (SPE) was used [21]. The sample separation was carried out on silica gel columns, Strata C-18 E 500 mg/6 ml from Phenomenex Inc. (Torrance, CA, USA). This particular silica gel column was chosen after testing several columns from different producers. By using of the Strata columns the most efficient removal of interfering substances and the best reproducibility were achieved.

The column was conditioned as follows: First it was washed with 10 ml of pure methanol followed by 10 ml water acidified with concentrated phosphoric acid (100 : 0.2 vol.). Immediately after the conditioning 50 ml of beer sample acidified with 0.1 ml phosphoric acid was filtered through the column. Afterwards the column was dried with an air stream for 5 minutes. The interfering substances were washed off with 10 ml of a solution of methanol-water-phosphoric acid (50 : 50 : 0.2 vol.). The elution of prenylflavonoids was accomplished with 2.5 ml methanol acidified with phosphoric acid (100 : 0.2. vol.) After strong stirring 10 μl of eluate were transferred to a liquid chromatography column. The efficiency of this analytical approach was verified using a test solution of 2 mg/l isoxanthohumol and 0.5 mg/l xanthohumol dissolved in 50g/l glucose in water. The yield was 91 ± 5 % for both prenylflavonoids.

2.3 HPLC analysis

The identification and determination of the beer components of interest was performed using a HPLC equipped with a diode-array detector (DAD). For the analysis chromatographs SHIMADZU LC 10A and LC 20A with columns Nucleosil EC, 240 x 4.0 mm 5 μm, C18 Hop (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D) and Gemini, 250 x 4.6 mm, 5 μm, C18 (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) were used. The mobile phase was composed of acetonitril-water-formic acid (700 : 300 : 3 vol.). For both columns an isocratic mobile phase flow rate of 0.8 ml/min was applied. The detection was carried out with a diode-array detector at wavelengths λ = 290 nm for isoxanthohumol, λ = 314 nm for α- and β- bitter acids and 370 nm for xanthohumol and DMX. Elution profiles of the hop components shown in Fig. 2 and 3 were very different. Using the Nucleosil EC column the hop components were eluted in the order IX, XN, bulk of 6 iso-α-acid isomers and last the residues of α-bitter acids (cohumulone, humilone and adhumulone). However, neither the separation of prenylflavonoids nor the clarity of the peaks was satisfactory. On the Gemini column the elution order was the same but the elution times were considerably longer and the clarity of the peaks was better. Due to the results of these preliminary tests only the Gemini column ex-



Obr. 3 Separace analytů na koloně Gemini, 250 x 4,6 mm, 5 μm, C18 (Phenomenex), mobilní fáze acetonitril : voda : kyselina mravenčí (700 : 300 : 3 obj.), průtok 0,8 ml.min⁻¹.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Obsah xanthohumolu a isoxanthohumolu v českých a zahraničních pivech

V tab. 1 jsou shrnuty výsledky stanovení obsahů xanthohumolu a isoxanthohumolu v českých světlých ležáckých pivech, které byly opakovaně měřeny v časovém období 2004 až 2009. Z údajů je patrné, že obsahy IX se pohybují v poměrně širokém rozmezí od 130 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ až po téměř 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrace XN jsou podstatně nižší, většinou pod hranici 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejvyšší obsah xanthohumolu byl nalezen v pivu B (174 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). V jiných pivech byly obsahy XN opakovaně pod mezí stanovitelnosti 5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Široká koncentrační variabilita prenylflavonoidů v pivech je způsobena meziodrůdovou a ročníkovou variabilitou obsahu XN a DMX ve chmelech. Dalším faktorem jsou změny obsahu prenylflavonoidů při zpracování na chmelové výrobky. Například široce používané CO_2 -extrakty neobsahují prakticky žádný xanthohumol, vzhledem k jeho nerozpustnosti v extrakčním médiu. Při výrobě granulí typu 90 se obsah prenylflavonoidů v porovnání se surovinou nemění, při výrobě granulí typu 45 se zvyšuje úměrně s obsahem α -kyselin. Při reálném chmelení v pivovarech se obsah prenylflavonoidů odvíjí od poměru extrakt-granule. Zajímavé je sledování stability obsahu prenylflavonoidů v ležáckých pivech v časovém horizontu 5 let. Ve většině piv jsou koncentrace prenylflavonoidů relativně stabilní, pakliže rozdíl v rozmezí 100 až 200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ budeme považovat za přirozený výkyv. U piva C však lze v daném časovém období zaznamenat trvalý pokles až na bezmála poloviční hodnoty (1900 \rightarrow 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Tak výrazné změny mohou souviset se změnou chmelení ve prospěch CO_2 -extraktů, o nichž je známo, že – na rozdíl od alkoholových – neobsahují prakticky žádný xanthohumol. Další příčinou může být změna odrůdy s nižším poměrem xanthohumol/ α -kyseliny. Změna odrůdy s vyšším poměrem xanthohumol/ α -kyseliny mohla pozitivně ovlivnit obsah IX v pivu E v roce 2009. Kolísání obsahu prenylflavonoidů může být také způsobeno počtem nasazení pivovarských kvasinek. Kvasinky mají tendenci prenylflavonoidy vázat na svém povrchu. Při opakovaném nasazení se míra jejich „nasycenosti“ zvyšuje, a tudíž pokles koncentrace v pivu v průběhu kvašení je menší [22]. V tab. 2 jsou uvedeny typické poměry xanthohumol/ α -kyseliny pro všechny české odrůdy chmele. Z hodnot je patrné, že nejvíce xanthohumolu se do varního procesu vnáší chmelením odrůdami Sládek a Žatecký červeňák.

Obsahy IX a XN v českých světlých výčepních pivech, uvedené v tab. 3, se pohybují v přibližně stejných intervalech jako v pivech ležáckých. Převažují piva s obsahem IX do 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ XN. Výčepní piva obsahují v průměru méně prenylflavonoidů vzhledem k nižšímu chmelení s vyšším podílem CO_2 -extraktů. Existují ale výčepní piva, která se obsahem prenylflavonoidů ležáckým pivům vyrovnají (pivo č. 7, 9). Velmi málo prenylflavonoidů obsahují světlá nealkoholická piva (tab. 4). Mezi tmavými pivy byl zdaleka nejlepší tmavý ležák č. 1 s největšími koncentracemi prenylflavonoidů ze

clusively was used for further experiments. The quantification of prenylflavonoids was made by means of external standards. The detection limit for IX was 10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and for XN 5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Satisfactory coefficients of variation (CV) of 3.4 % for XN and 2.5 % for IX ($n = 10$) were obtained.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Contents of xanthohumol and isoxanthohumol in Czech and foreigner beers

Tab. 1 shows the results of a determination of xanthohumol and isoxanthohumol in Czech pale and lager beers repeatedly measured between 2004 and 2009. The content of IX varied in a wide range from 130 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ to almost 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. The concentrations of XN are considerably lower, mostly under 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. The highest xanthohumol content was found in the beer B (174 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). In the other beers the content of XN was regularly under the determination limit of 5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. The broad concentration variability of prenylflavonoids in beers is caused by the different contents of XN and DMX in the hops used, which on other hand depends on the harvest year and the hop variety. The other factors are the losses of prenylflavonoids during the fabrication of hop products. For example the frequently used CO_2 -extracts contain nearly no xanthohumol due to its insolubility in the extract solvent. The content of prenylflavonoids during the production of hop pellets type 90 remains unchanged when compared with raw material whereas during the production of pellets type 45 it is enhanced proportionally with the content of α -acids. During the real hopping in breweries the content of prenylflavonoids depends on the rate of extract-pellets. Also a monitoring of the stability of the prenylflavonoid content in lager beers over a time period of 5 years brought interesting results. In the majority of beers the concentration of prenylflavonoids remains stable assuming that the differences ranging from 100 to 200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ are considered as the natural fluctuation. However, in the same time period the content of prenylflavonoids in beer C dropped almost to half of the initial value (from 1900 to 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Such a significant change can be related to an alteration of the hopping. The use of CO_2 -extracts with almost no xanthohumol instead of alcohol extracts can cause such a reduction. Another reason could be the use of a different hop variety with lower xanthohumol/ α -acids ratio. The use of a hop variety with a higher xanthohumol/ α -acids ratio possibly had a positive influence on the IX content in beer E in the year 2009. The fluctuation of prenylflavonoid contents could be also influenced by a number of pitching yeasts. The yeasts had namely had the ability of binding prenylflavonoids to

Tab. 2 Obsah alfa kyseliny, xanthohumolu a poměr XN/alfa v českých odrůdách chmele / Contents of α -acids, xanthohumol and the XN/ α -acids ratios in Czech hop varieties

Odrůda Variety	Alfa kyseliny (% hm.) Alpha-acids (% w)	Xanthohumol (% hm.) Xanthohumol (% w)	Poměr XN/ α -acids*100 XN/ α -acids ratio*100
Žatecký červeňák Saazer	2.5–4.0	0.30–0.50	9–12
Sládek Sladek	4.5–7.0	0.50–0.75	10–14
Harmonie Harmonie	5.0–8.0	0.40–0.70	7–9
Bor Bor	6.0–9.0	0.40–0.60	5–7
Premiant Premiant	7.0–10.0	0.30–0.50	4–6
Rubín Rubin	9.0–12.0	0.45–0.75	4–6
Agnus Agnus	9.0–12.0	0.70–1.10	7–9
Vital Vital	12.0–16.0	0.70–1.00	6–8
Kazbek Kazbek	5.0–8.0	0.30–0.45	4–6

Tab. 1 Koncentrace isoxanthohumolu (IX) a xanthohumolu (XN) v českých světlých ležáckých pivech v období 2004 až 2009 (obsahy jsou uvedeny v $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) / Concentrations (in $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) of isoxanthohumol (IX) and xanthohumol (XN) in Czech pale lager beers collected over the time period from 2004 to 2009

Pivovar Brewery	IX/XN	2004	2005	2006	2008	2009
A	IX XN	862 –	842 15	– –	612 17	782 16
B	IX XN	1731 –	1744 149	– –	1473 72	1754 174
C	IX XN	1874 –	1947 69	1346 46	– –	1028 27
D	IX XN	1074 –	1019 16	1174 25	1094 42	– –
E	IX XN	650 –	685 15	798 32	590 < 5	1106 16
F	IX XN	– –	625 125	– –	– –	635 111
G	IX XN	226 –	– –	271 < 5	– –	416 10
H	IX XN	375 –	338 < 5	– –	133 < 5	221 < 5

Tab. 3 Koncentrace isoxanthohumolu (IX) a xanthohumolu (XN) v českých světlých výčepních pivech v období 2004 až 2009 / *Concentrations of isoxanthohumol (IX) and xanthohumol (XN) in Czech pale draft beers collected over the time period from 2004 to 2009*

Označení piva Beer code	IX/XN	Obsah (μg/l) Content (μg/l)	Označení piva Beer code	IX/XN	Obsah (μg/l) Content (μg/l)
1	IX XN	841 65	8	IX XN	723 17
2	IX XN	321 –	9	IX XN	1091 55
3	IX XN	248 < 5	10	IX XN	250 11
4	IX XN	359 –	11	IX XN	996 24
5	IX XN	731 –	12	IX XN	519 34
6	IX XN	144 < 5	13	IX XN	389 47
7	IX XN	1650 116	14	IX XN	740 21

všech hodnocených piv; 2522 μg.l⁻¹ IX a 505 μg.l⁻¹ XN. V tab. 5 jsou shrnuty výsledky stanovení obsahu isoxanthohumolu v souboru světlých i tmavých zahraničních piv. Piva byla zakoupena v běžné obchodní síti v ČR i zahraničí. Výsledky ukazují, že zjištěné koncentrace IX nijak nevybočují z rozmezí, která byla naměřena v českých pivech. Nálezy IX pod hranicí 10 μg.l⁻¹ v ležáckých pivech II a VII svědčí o tom, že piva byla chmelena výhradně CO₂-extraktem. Na základě analytických hodnot obsahu IX a XN v pivech české i zahraniční provenience lze konstatovat, že koncentrace IX kolem 2,0 mg.l⁻¹ a do 1,0 mg.l⁻¹ XN jsou přibližně maximem, které lze v pivech dosáhnout běžnou technologií. Chceme-li vyrobit piva s obsahy nad uvedenou hranicí, je nutné provést různé technologické úpravy a použít preparáty se zvýšeným obsahem xanthohumolu. Na trhu jsou již výrobky, které obsahují více než 80 % XN [23]. Další možnosti podstatného zvýšení koncentrací xanthohumolu v pivech je použití speciálních tmavých sladů. Tmavá piva většinou obsahují více XN a IX než piva světlá. Bylo zjištěno, že xanthohumol se váže na látky proteinového charakteru obsažené v tmavých sladech, čímž se inhibuje izomerace XN na IX. Tyto proteiny jsou rozpustné ve vodě a mají molekulovou hmotnost kolem 3000 Da [24]. Použitím chmelových produktů obohacených xanthohumolem, úpravou jejich dávkování, speciálních tmavých sladů a jejich výtažků, je možné zvýšit koncentrace xanthohumolu na 3,5 μg.l⁻¹ ve světlých pivech a více než 10 mg.l⁻¹ v tmavých pivech. Koncentrace IX mohou být současně 8,0 až 9,0 mg.l⁻¹ [22].

Piva obohacená prenylflavonoidy tvoří tržní segment speciálních piv s relativně malou spotřebou. Ani v budoucnu nelze očekávat výrazný nárůst produkce, mj. i díky vyšší ceně. S ohledem na stále se snižující spotřebou α-kyselin na hektolitr piva, která se v současné době blíží hranici 4 g.hl⁻¹, lze usuzovat, že průměrný obsah prenylflavonoidů v běžných pivech bude mít analogický trend.

Tab. 4 Koncentrace isoxanthohumolu (IX) a xanthohumolu (XN) v českých tmavých a nealkoholických pivech v období 2004 až 2009 / *Concentrations of isoxanthohumol (IX) and xanthohumol (XN) in Czech dark and non-alcoholic beers collected over the time period from 2004 to 2009*

Nealkoholická piva Non-alcoholic beers			Tmavá piva Dark beers		
Označení piva Beer code	IX/XN	Obsah (μg/l) Content (μg/l)	Označení piva Beer code	IX/XN	Obsah (μg/l) Content (μg/l)
1 – světlé 1 – pale	IX XN	234 < 5	I – ležák I – lager	IX XN	2522 505
2 – světlé 2 – pale	IX XN	135 < 5	II – ležák II – lager	IX XN	536 30
3 – tmavé 3 – dark	IX XN	623 140	III – výčepní III – draft	IX XN	294 51

Tab. 5 Koncentrace isoxanthohumolu (IX) ve světlých i tmavých zahraničních pivech / *Concentrations of isoxanthohumol (IX) in foreign pale and dark beers*

Označení Code	Specifikace piva Beer type	Země původu Origin	Obsah (μg/l) Content (μg/l)
I	světlý ležák pale lager	JAP	975
II	světlý ležák pale lager	NED	< 10
III	světlý ležák pale lager	AUT	250
IV	světlý ležák pale lager	BEL	470
V	pšeničný speciál wheat special	BEL	250
VI	svrchně kvašený speciál top fermented special	BEL	350
VII	tmavý ležák dark lager	IRL	< 10
VIII	tmavý ležák dark lager	IRL	1420
IX	světlý ležák pale lager	USA	370

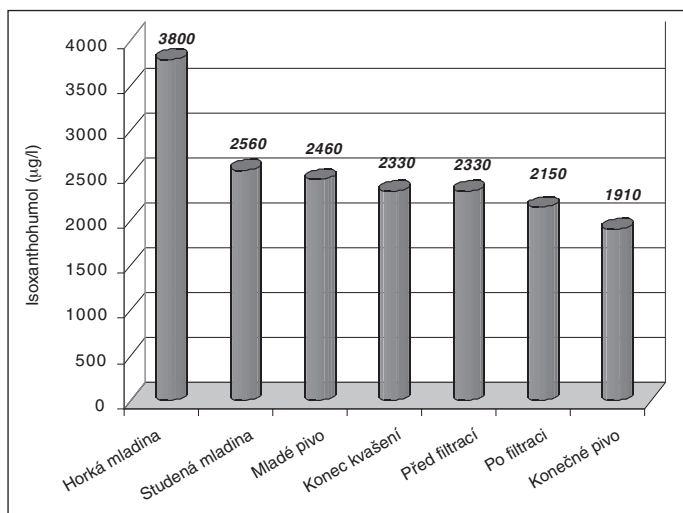
their surface. By repeated utilisation the degree of the saturation was increased. Consequently the reduction of prenylflavonoids in beer during the fermentation was lower [22]. The Tab. 2 gives an overview of the typical had xanthohumol/α-acids had for all varieties of Czech hops. Hopping with the varieties Sladek and Saazer brings the largest amount of xanthohumol in the brewing process.

The contents of IX and XN in Czech pale draft beers (Tab. 3) were found to be in approximately the same range as in lager beers. Most of the beers contain up to 1000 μg/l IX and up to 100 μg/l XN. Draft beers contain on average lower amounts of prenylflavonoids because of a less rich hopping combined with a higher portion of CO₂-extracts. However, some draft beers (Nos. 7 and 9) reached the same content of prenylflavonoids as in lager beers. Very small amounts of prenylflavonoids are found in pale non-alcoholic beers (Tab. 4). Among the dark beers, the dark lager beer No. 1 was by far the best with the highest prenylflavonoids content of all the beers – 2522 μg/l IX and 100 μg/l XN. Tab. 5 shows the results overview for isoxanthohumol determinations in pale and dark foreign beers. The beers were bought in the common sales network in Czech Republic or abroad. The measured concentrations of IX were comparable with the values found in Czech beers. The determined values for IX under the limit of 10 μg/l in lager beers II and VII is evidence that the beer hopping was made exclusively with CO₂-extract. Based on the analytical values found for IX and XN in Czech and foreign beers it can be noted that the concentrations of about 2.0 mg IX/l and up to 1.0 mg XN/l are just about the maximum which it is possible to reach by using common beer technology. For the production of beers with a higher content of prenylflavonoids it is necessary to bring about different technological changes and to utilize xanthohumol-enriched hop extracts. Extracts containing more than 80% XN are already available on the market [23]. Another possibility for a considerable increase in xanthohumol concentration in beers is the use of special dark malts. Dark beers mostly contain more XN and IX than pale beers. It was found that because of xanthohumol adhesion to protein material present in dark malts the isomerisation of XN to IX is inhibited. The proteins concerned are water soluble with a molecular weight of 3000 Da [24]. Due to use of hop products enriched in xanthohumol, the adjustment of their dosage and to the utilization of special dark malts and their extracts it is possible to enhance the xanthohumol concentration up to 3.5 mg/l in pale beers and more than 10 mg/l in dark beers. At the same time the isoxanthohumol concentrations can reach 8.0 to 9.0 mg/l [22].

Prenylflavonoids enriched beers form a market segment with a relatively low consumption and no significant production increase can be expected in the future due, among other things to the higher prices. With regard to the constantly lower need for α-acids in beer, which is currently 4 g/hl, it can be noted that the average content of prenylflavonoids in common beers will have an analogous trend.

3.2 Koncentrační změny isoxanthohumolu v průběhu výroby piva

Koncentrační změny isoxanthohumolu v průběhu výroby piva byly zkoumány při výrobě světlých 12% ležáků ve dvou průmyslových pivovarech s odlišnou technologií kvašení, CK tancích (pivovar A) a na spilce/ležáckých tancích (pivovar B). V průběhu výroby byly z technologických linek odebrány vzorky pivovarských meziproductů a piv, ve kterých byl měřen obsah IX. Vzorky byly uchovány v lednici při teplotě +4 °C až do doby zpracování, tj. do 5 dnů po odběru. Výsledky stanovení obsahu IX ve vzorcích mladiny, mladých piv, piv před a po filtraci (křemelina) a konečných piv jsou uvedeny ve sloupcových diagramech na obr. 4 a 5. Výsledky potvrzují, že v průběhu výroby piva dochází k výrazným ztrátám isoxanthohumolu, zejména při chlazení mladiny, kvašení a filtraci. Jen při chlazení horké mladiny v pivovaru A ubyla třetina původní koncentrace IX. Celkové ztráty IX v pivovaru A v řadě horká mladina-pivo činily téměř 50 % rel. Ještě vyšší ztráty byly zjištěny v pivovaru B, kde ztráty mezi studenou mladinou a konečným pivem byly bezmála 60 % rel. Naproti tomu bylo prokázáno, že pasteurace piva nemá na obsah isoxanthohumolu průkazný vliv. Další ztráty, které provedené testy nezahrnují, vznikají nedokonalým rozpuštěním xanthohumolu v mladině. V nezávislých varních testech ve čtvrtprovozním měřítku bylo zjištěno, že po 90minutovém chmelovaru při 100% chmelení na začátku chmelovaru bylo ve chmelovém mlátu nalezeno 10 až 15 % původního množství xanthohumolu. To je v dobré relaci s údaji, které uvádí Magalhães, který v podmínkách minipivovaru s postupným chmelením na 3 dávky naměřil ztráty XN z důvodu nedokonalé extrakce ve výši 17 až 21 % [25]. Vzhledem k tomu, že model chmelení v řadě pivovarů je založen na postupném dávkování různých chmelových výrobků (extrakty-granule), mohou být ztráty dané nedokonalým rozpuštěním XN v mladině ještě vyšší. Na základě zjištěných skutečností lze celkový stupeň využití prenylflavonoidů (XN a IX) v pivech vyrobených v průmyslových pivovarech odhadovat na 20 až 30 %, což je ve shodě s publikovanými údaji [14].



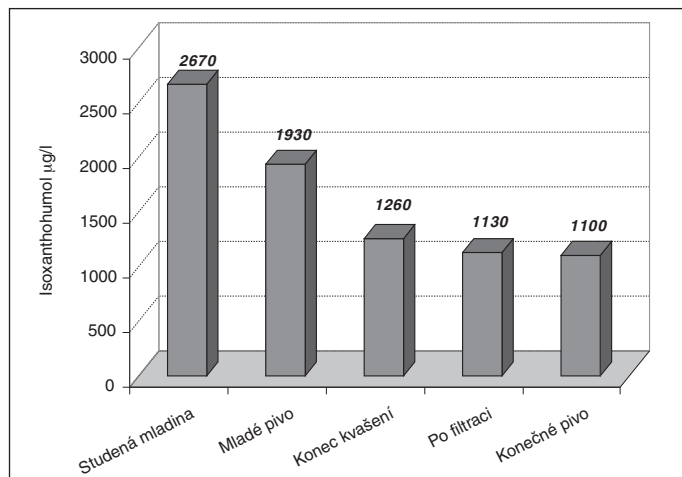
Obr 4 Obsah isoxanthohumolu v meziproductech výroby piva technologií CKT při výrobě 12% světlého ležáku / Fig. 4 Contents of xanthohumol in intermediate products during the production of pale 12% lager beer using the CCK technology

3.3 Stabilita isoxanthohumolu a xanthohumolu během skladování piva

Stabilita prenylflavonoidů v pivech byla zkoumána ve světlém a tmavém ležáku po dobu tří měsíců. Piva, zakoupená v běžné obchodní síti, byla uchována v temnu při teplotách +3 °C a +20 °C. Koncentrace XN a IX byly měřeny po 6 a 12 týdnech skladování. Výsledky sledování jsou uvedeny na obr. 6 a 7. Úbytek isoxanthohumolu ve světlém ležáku byl po 6 týdnech skladování, nezávisle na teplotě, přibližně 8 % rel. Po dalších 6 týdnech poklesl obsah IX celkově o 10,9 % při teplotě skladování 3 °C, o 12,1 % při 20 °C. V tmavém ležáku se koncentrace IX po 6 týdnech prakticky nezměnila. K poklesu došlo až po 12 týdnech skladování při 20 °C, a to zhruba o 10 % rel. Koncentrace xanthohumolu v tmavém ležáku klesaly lineárně s časem a nezávisle na teplotě skladování tak, že po 12 týdnech skladování

3.2 Changes of isoxanthohumol concentration during a beer production

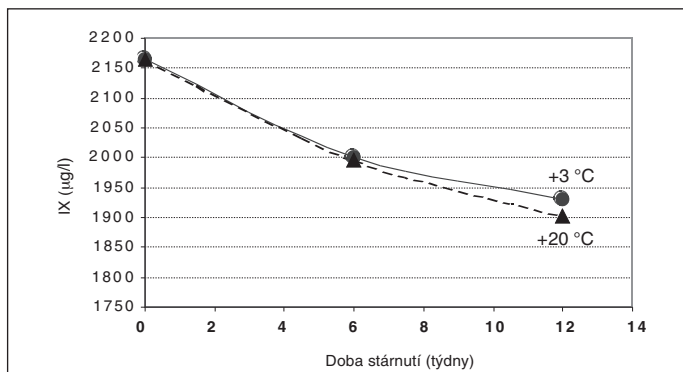
Changes in isoxanthohumol concentration during beer production were examined for pale 12% lager beers in two industrial breweries with a different fermentation technologies; in cylindro-conical fermenters (CCF) (brewery A) and in storage tanks in fermenting cellars (brewery B). The sample of intermediates and beers were taken during the production and the content of IX measured. The samples were kept in a refrigerator at 4°C until the processing meaning up to 5 days after the sampling. Figures 4 and 5 show in bar charts the results of the determinations of IX contents in samples of hopped wort, finished beers, beers before and after filtration through kieselguhr and bottled beers. The results confirmed large losses of isoxanthohumol during beer processing especially during cooling of hopped wort, fermentation and filtration. For example, during the cooling of hot wort in brewery A the IX concentration decreased by one-third. In brewery A the total loss of IX during the production process from boiled wort to bottled beer was about 50 % rel. Even higher losses were found in the brewery B. During the production process from cold wort to bottled beer the content of IX fell by almost 60 % rel. On the contrary it was proven that a pasteurisation process does not significantly influence the content of isoxanthohumol. Further losses, which were nevertheless not tested, come about due to insufficient dissolution of xanthohumol in the wort. Independent brewing tests at a quarter of the operating scale proved that after 90 minutes of hop brewing and 100% hopping at the beginning of the process only 10 to 15% of the original xanthohumol was found in spent hops. These values correspond to values by Magalhães. In terms of a mini-brewery and with a hopping made at three rates the measured losses of XN caused by insufficient extraction amounted to between 17 and 21 % [25]. As the hopping in a number of breweries is based on a gradual dosing of different hop products as extracts or pellets, it is possible that the losses due to insufficient dissolution of xanthohumol in the wort are even higher. Based on these facts the retention of prenylflavonoids (XN and IX) in beers is approximately 20 to 30 %. Such values are in a good agreement with the published values [14].



Obr 5: Obsah isoxanthohumolu v meziproductech výroby piva klasickou technologií kvašení při výrobě 12% světlého ležáku / Fig. 5 Contents of xanthohumol in intermediate products during the production of pale 12% lager beer using the classical fermentation process

3.3 Stability of isoxanthohumol and xanthohumol during the beer storage

The stability of prenylflavonoids in beer was examined in pale and dark lager beer for three months. The beers bought in the common sales network were kept in a dark room at 3 °C and at 20°C. The concentrations of XN and IX were determined after 6 and 12 weeks storage. The results are given in Fig. 6 and 7. The decrease in isoxanthohumol content in the pale lager beer after 6 weeks storage was about 8% regardless of the storage temperature. After a further 6 weeks the isoxanthohumol content decreased by 10.9 % of total at the storage temperature 3 °C and by 12.1 % of total at 20 °C. In the dark lager beer the concentration of IX remained almost unchanged. The concentration dropped only after 12 weeks storage at 20 °C, namely by 10 %. The concentration of xanthohumol in the dark lager



Obr. 6 Koncentrace IX ve světlém ležáku po 6 a 12 týdnech skladování / Fig. 6 Contents of IX in pale lager after 6 to 12 weeks of storage

ubyla zhruba třetina původního množství xanthohumolu. Stabilita isoxanthohumolu v pivech, při správném skladování v chladu a temnu, je velmi dobrá. Rovněž stabilitu xanthohumolu je možno označit za uspokojivou s ohledem na skutečnost, že během 3 měsíců od výroby je převážná část produkce pro tuzemský trh zkonsumována.

4 ZÁVĚR

Obsah isoxanthohumolu ve většině různých značek českých a zahraničních piv nepřesáhl hranici 2000 µg.l⁻¹. Množství xanthohumolu bylo většinou do 100 µg.l⁻¹. Koncentrace prenylflavonoidů v pivech jsou velmi proměnlivé a zjevně souvisí se strategií chmelení v jednotlivých pivovarech. Obsahy isoxanthohumolu pod hranicí 200 µg.l⁻¹ svědčí o tom, že při chmelení byl z velké části použit CO₂-extrakt. Hladinu isoxanthohumolu lze pozitivně ovlivnit výběrem odrůdy chmele s vysokým poměrem XN/α-kyseliny. V tomto směru jsou nejlepší české odrůdy Sládek a Žatecký červeňák. K největším ztrátám xanthohumolu, které byly sledovány v provozních podmínkách dvou průmyslových pivovarů, dochází při chlazení mladiny, kvašení a filtraci. Míra využití XN při výrobě piva v provozním měřítku je zhruba 20 až 30 %, což je ve velmi dobré shodě s údaji, které byly publikovány pro poloprovozní pivovarské testy. Sledování stability obsahu prenylflavonoidů v hotových lahvových pivech, prováděné po dobu 3 měsíců, ukázalo, že úbytek IX se pohybuje v rozmezí 10 až 15 % v závislosti na skladovací teplotě. Úbytek XN činil přibližně třetinu původního množství. Stabilitu prenylflavonoidů v pivech, při správném skladování v chladu a temnu, je možno označit za uspokojivou s ohledem na skutečnost, že během 3 měsíců od výroby je převážná část produkce pro tuzemský trh zkonsumována.

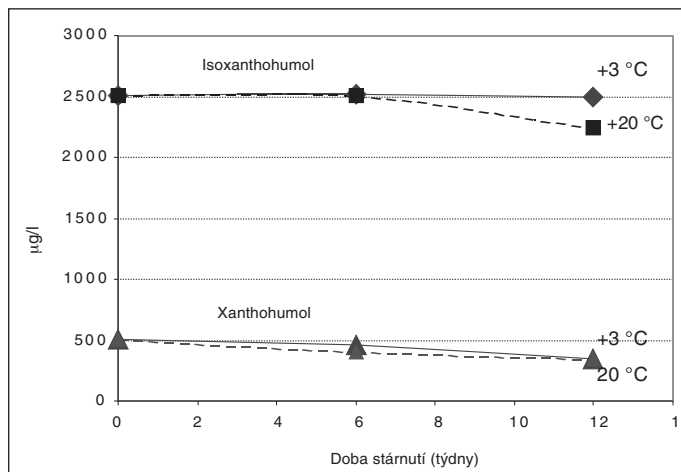
Poděkování

Tato studie byla vypracována jako součást řešení výzkumného zá-
měru MSM1486434701.

Recenzovaný článek
Do reakce došlo 15. září 2009
Přijato k publikování: 29.10. 2009

Literatura/References

- Stevens, J. F., Page, J. E.: Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health? *Phytochemistry* **65**, 2004, 1317–1330.
- Henderson, M. C., Miranda, C. L., Stevens, J. F., Deinzer, M. L., Buhler, D. R.: In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hop, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica* **30**, 2000, 235–251.
- Miranda, C. L., Aponso, G. L. M., Stevens, J. F., Deinzer, M. L., Buhler, D. R.: Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Cancer letters* **149**, 2000, 21–29.
- Miranda, C. L., Yang, Y. H., Henderson, M., Stevens, J. F., Santana-Rios, G., Deinzer, M. L., Buhler, D. R.: Prenylflavonoids from hops inhibit the metabolic activation of the carcinogenic heterocyclic amine 2-amino-3-methylimidazo(4,5-F)quinoline, mediated



Obr. 7 Koncentrace XN a IX v tmavém ležáku po 6 a 12 týdnech skladování / Fig. 7 Contents of XN and IX in dark lager after 6 to 12 weeks of storage

beer decreased linearly over the time period and was independent of the storage temperature. After 12 weeks storage the initial amount of xanthohumol had diminished about one third. The stability of isoxanthohumol in beer is very good under appropriate cool and dark storage conditions. The stability of xanthohumol is also quite satisfactory assuming that during the 3 months since production the bulk beer for the domestic consumption has already been sold.

4 CONCLUSIONS

The isoxanthohumol content in most Czech and foreign beers of different brands did not exceed the level of 2000 µg/l. The content of xanthohumol was mainly up to 100 µg/l. The concentrations of prenylflavonoids in beers are very variable and depend obviously on the kind of beer hopping in different breweries. Isoxanthohumol contents under the level of 200 µg/l indicate that the hopping was carried out with CO₂-extract. The content of isoxanthohumol can be enhanced by a hop variety with high XN/α-acids ratio such as Sládek or Saazer. It was found, in full scale operating production in two industrial breweries that the biggest losses of xanthohumol were caused through wort cooling, fermentation and filtration. The retention of XN in full scale operating beer production is about 20 to 30%. These values are in a good agreement with values published for XN retention for beer production in pilot tests. The stability monitoring of prenylflavonoid contents in bottled beers, carried out over 3 months demonstrated that the reduction of IX varied in a range from 10 to 15 % depending on the storage temperature. The loss of XN was about one third of the initial amount. The stability of prenylflavonoids in beers is satisfactory, when stored in a cool and dark environment and assuming that the majority of a beer production for a domestic market will be already consumed.

Acknowledgments

This study was accomplished in terms of The Research Project MSM1486434701.

Translated by Eva Paterson

by CNDA-expressed human CYP1A2. *Drug Metab. Disp.* **28**, 2000, 1297–1302.

- Gerhäuser, C.: Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European J. Cancer* **41**, 2005, 1941–1954.
- Tobe, H. et al.: Bone resorption inhibitors from hop extracts. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 1997, 158–159.
- Kondo, K.: Preventive effects of dietary beer on lifestyle-related diseases. *Proceedings of the 29th EBC Congress, Dublin, 2003; Contribution* 133.
- Milligan, S. R. et al.: Identification of a potent phytoestrogen in hops and beer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 1999, 2249–2252.
- Rong, H., Zhao, Y., Lazou, K., De Keukeleire, D., Milligan, S. R., Sandra P.: Quantitation of 8-Prenylnaringenin, a Novel Phytoestrogen in Hops, Hop Products and Beers by Benchtop HPLC-MS Using Electrospray Ionization. *Chromatographia* **51**, 2000, 545–552.

10. Krofta, K.: Hodnocení kvality chmele. Metodika pro praxi. Chmelářský institut Žatec, 2008, ISBN 978-80-86836-84-3.
11. Possemiers, S. et al.: Activation of Proestrogens from Hops by Intestinal Microbiota; Conversion of Isoxanthohumol into 8-Prenyl-naringenin. J. Agric. Food Chem. **53**, 2005, 6281–6288.
12. Possemiers, S. et al.: The prenylflavonoid Isoxanthohumol from Hops is Activated into the Potent Phytoestrogen 8-Prenyl-naringenin In Vitro and in the Human Intestine. J. Nutrition **136**, 2006, 1862–1867.
13. Forster, A., Gahr, A., Ketterer, M., Beck, B., Massinger, S.: Xanthohumol in Bier – Möglichkeiten und Grenzen einer Anreicherung. Monatsschr. Brauwiss. 9/10, 2002, 184–194.
14. Stevens, J. F. et al.: Fate of Xanthohumol and Related Prenylflavonoids from Hops to Beer. J. Agric. Food. Chem. **47**, 1999, 2421–2428.
15. Forster, A., Koberlein, A.: Der Verbleib von Xanthohumol aus Hopfen während der Bierbereitung. Brauwelt **37**, 1998, 1677–1679.
16. Stevens, J. F., Taylor, A. W., Deinzer, M. L.: Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chrom. A **832**, 1999, 97–107.
17. Magalhães, P. J., Guido, L. F., Cruz, J. M., Barros, A. A.: Analysis of xanthohumol and isoxanthohumol in different hop products by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Chrom. A, **1150**, 2007, 295–301.
18. Tekel, J. et al.: Determination of the Hop-Derived Phytoestrogen, 8-Prenyl-naringenin, in Beer by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. **47**, 1999, 5059–5063.
19. Biendl, M., Mitter, W., Methner, F. J.: Use of xanthohumol-rich hop products in beer production. Brauwelt Int. 2002/I, 39–42.
20. Biendl, M., Methner, F. J., Stettner, G.: Brauversuche mit einem xanthohumolreichen Hopfenprodukt. Brauwelt **43**, 2004, 236–241.
21. Stettner, G. et al.: Use of a new xanthohumol-rich hop product in the brewhouse – fate of xanthohumol during beer production and influence of non specific hop compounds on the bitterness of beer. Proceedings of the 29th EBC Congress, Dublin, 2003; Contribution 138.
22. Wunderlich, S., Zürcher, A., Back, W.: Enrichment of xanthohumol in the brewing process. Mol. Nutr. Food Res. **49**, 2005, 874–881.
23. Biendl, M.: Development of new plant extracts rich in hop polyphenols. Proceedings of the 31th EBC Congress, Venezia, 2007; Contribution 110.
24. Walker, C., Lence, C. F.: Investigation into the high levels of xanthohumol found in Stout and Porter style beers. Brauwelt Int., 2004/II, 100–103.
25. Magalhães, P. J., Dostálek, P., Cruz, J. M., Guido, L. F., Barros, A. A.: The impact of a Xanthohumol-Enriched hop Products on the Behavior of Xanthohumol and Isoxanthohumol in Pale and Dark Beers: A Pilot Scale Approach. J. Inst. Brew. **114**, 2008, 246–256.

Stanislav Bernard: „Je možné vypít 50 plaveckých bazénů piva?“



Rodinný pivovar Bernard v roce 2009 dosáhl rekordního výstavu přesahujícího 204 tis. hektolitřů nepasterizovaného piva Bernard.

„Rekordní výstav pivovaru v roce 2009 přesáhl 204 tisíc hektolitřů, což představuje více než 40 milionů půllitrů piva. Na každého Čecha tak připadají čtyři nepasterizovaná piva BERNARD.“ počítá spolumajitel pivovaru Stanislav Bernard a pro

zajímavost doplňuje: *„Pokud bychom tato čísla převedli na počet plaveckých bazénů o velikosti 25 x 12 x 1,35m, naplnili bychom jich 50.“* „Odhaduji, že meziročně celý obor poklesl přibližně o 10 procent,“ komentuje Stanislav Bernard a dodává: *„Náš nárůst téměř o 9 procent přičítám především rostoucímu zájmu o chuťově zajímavé tradičně vyráběné české pivo.“*

K rekordnímu výstavu piva přidal pivovar i dalších 20 významných ocenění. Největší počet (13) byl tradičně za kvalitu nepasterizovaného piva BERNARD. Třikrát byla značka BERNARD oceněna sdružením CZECH TOP 100, když se poosmé v řadě stala nejobdivovanější firmou kraje Vysočina. Ve stejné soutěži je i čtvrtou nejobdivovanější firmou České republiky v oboru potravinářský průmysl a magazín Vlastní cestou zvítězil v kategorii firemních časopisů. Další ocenění získal magazín v soutěži PR klubu ČR „Zlatý středník“, kde obsadil 3. Místo v kategorii „Nejlepší B2C časopis“ a získal i „zvláštní ocenění za nejlepší obrazovou výstavu“. Značka BERNARD potvrdila svoji oblíbenost 2. místem v soutěži popularity značek piv v ČR „Naše pivo 2009“. Oceněno bylo i grafické ztvárnění etikety „BERNARD s těžkou hlavou“ v soutěži o nejlepší etiketu na Táborských slavnostech piva.

Podle TZ Bernard

Stock Plzeň vytvořil loni další rekord a prodal téměř 28 milionů litrů lihovin

Společnost Stock Plzeň-Božkov, největší výrobce lihovin v České republice, v roce 2009 prodala 27,99 milionu litrů lihovin. Jedná se o absolutně nejvyšší objem, jaký kdy český výrobce dokázal realizovat v průběhu dvanácti měsíců. Mimořádná situace se projevila především v posledním měsíci roku, kdy Stock Plzeň prodal 5,3 milionu litrů lihovin oproti 3,7 milionu litrů v prosinci 2008.

Loňský odbyt 27,99 milionu litrů je oproti roku 2008 vyšší o 5 %. Nebýt státem avizovaného zvýšení spotřební daně, vzrostl by podle Petra Pavlíka zhruba o 2 %. „První čtvrtletí letošního roku bude pro

všechny výrobce lihovin určitě znamenat dočasný útlum poptávky právě kvůli předzásobením ze strany obchodníků,“ soudí Petr Pavlík.

Významný podíl na loňském zvýšení odbytu měly vlajkové značky Stocku Plzeň – Fernet Stock a Fernet Stock Citrus, které se na předvánočním trhu představily se zcela novým designem lahve a etikety. K rozhodujícím tahounům patřila rovněž řada Božkov, která celkově posílila o 11 %. V rámci řady Božkov si nejlépe vedl tuzemák Božkov Tuzemský, vůbec nejprodávanější domácí lihovina. Nezaostala ani populární „zelená“ Božkov Peppermint, která si v prodeji připsala navíc 10 %. Pozici nejprodávanější vodky na českém trhu si upevnila Božkov Vodka. Velmi příznivě se vyvíjel i odbyt lihovin z distribučního portfolia Stocku Plzeň zahrnujícího například finskou Vodka Koskenkorva, irskou whiskey Tullamore Dew, skotskou whiskey Teacher's, Greenall's Gin, Tequilu Sombra Negro či vermuty a aperitivy Garrone. V loňském roce odbyt těchto značek dosáhl téměř 1,7 milionu litrů, což představuje meziroční růst o 8 %. Vůbec největší úspěch znamenala irská whiskey Tullamore Dew, která vzrostla o 32 % a je vůbec nejprodávanější značkou své kategorie v Česku.

Stock Plzeň je lídrem českého trhu lihovin s celkovým tržním podílem zhruba 40 %. Stock Plzeň přitom se svými značkami vévodí všem čtyřem rozhodujícím segmentům trhu: hořkým a bylinným lihovinám (Fernet Stock, Fernet Stock Citrus), tuzemákům (Božkov Tuzemský), vodkám (Vodka Amundsen, Božkov Vodka) a likérům (Božkov Peppermint, Božkov Griotte).

Podle TZ Stock Plzeň – Božkov

Lednové přírůstky do knihovny pivovarské literatury

V lednu 2010 byly uvedeny na trh hned dvě nové knihy s pivovarskou tematikou, které jsou již dlouho očekávány a nesporně obohatí knihovnu každého zájemce o náš obor.

Pro vysokoškolské studenty a pivovarské profesionály je určena **učebnice pivovarovství**, jejíž autorskou je profesorka Ing. Gabriela Basařová, DrSc. Vzhledem k tomu, že poslední publikace tohoto typu (i když s trochu jiným určením i tematickým záběrem) přišla na trh již před deseti lety (Technologie výroby sladu a piva, VÚPS, a. s., 2000, k dispozici ještě omezené množství reedice na CD-ROM), kniha se v nabídce vydavatelství VŠCHT v Praze nejspíš dlouho neohřeje.

Druhá novinka je určena spíše sběratelům a zájemcům o pivovarskou historii. Nakladatelství Libri, spol. s r. o., uvedlo v polovině ledna na trh **Encyklopedii pivovarů Čech, Moravy a Slezska, II. díl, Jižní Čechy**. Ani autora této publikace není třeba představovat. Je jím Pavel Jakl, jeden z našich špičkových pivovarských historiků. Věřme, že do realizace třetího dílu uplyne méně času, než mezi oběma prvními díly.

Podrobnější informací o obou knihách přinese Kvasný průmysl v recenzích v některém z příštích čísel.